

(19)



(10) **LT 5057 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **5057**
- (21) Paraiškos numeris: **2001 115**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2001 12 05**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2003 06 25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2003 09 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:
Rapolas LIUŽINAS, LT
Antanas DIDŽIAPETRIS, LT
Karolis JANKEVIČIUS, LT
Mečislavas KMITA, LT
Rita VIZBARIENĖ, LT
Dalia ZVEROČKINIENĖ, LT
Vida ŠATINSKIENĖ, LT
- (73) Patento savininkas:
Viešoji įstaiga „GRUNTO VALYMO TECHNOLOGIJOS“, Antakalnio g. 42, 2055 Vilnius, LT
- (74) Patentinis patikėtinis:
Genė Ona SRUOGIENĖ, UAB „TARPINĖ“, A.P.Kavoliuko g. 24-152, LT-2050 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Biopreparatas nafta ir jos produktais užterštam gruntui ir vandeniui valyti, jo gavimo būdas ir panaudojimas

- (57) Referatas:
Išradimas priklauso biotechnologijos ir aplinkos apsaugos sritims, skirtas nafta ir jos produktais užterštam gruntui ir vandeniui valyti įvairiose gamtinėse klimato zonose. Valymui naudojamas biopreparatas, kurį sudaro naftos angliavandenilius ardančių tarpusavyje susijusių medžiagų apykaitos produktų mainais hidrofilinių ir

Išradimas priklauso biotechnologijos ir aplinkos apsaugos sritims, būtent, nafta ir jos produktais užterštam gruntui ir vandeniui valyti, naudojant naftą oksiduojančių mikroorganizmų konsorciumą preparato pavidalu.

Grunto, vandens apvalymui nuo naftos bei jos produktų, ar tai būtų valoma *ex-situ* bei *in-situ*, naudojami naftą oksiduojantys mikroorganizmai (NOM). Gaminami NOM preparatai. Žinomi preparatai gruntui ir vandeniui nuo naftos produktų valyti, sukurti naudojant vieną NOM štamą: naudojant *Pseudomonas* naftą oksiduojančius mikroorganizmus (TSRS a. l. Nr. Nr. 1 076 446, 1 428 809), preparatas, kuriame naudojamas NOM *Rhodococcus erythropolis* (RU patentas Nr. 2 019 527), biopreparatas su *Actinomucor sp.* (JAV patentas Nr. 4 415 662), o taip pat biopreparatas su *Acinetobacter valentis subspecies paraffinicum* (RU Nr. 2 053 204).

Šių preparatų trūkumas - juose panaudotas tik vienas NOM štamas. Šio tipo biopreparatai pasirodė mažai aktyvūs, nes naftos produktų ardymas yra daugiastadijinis procesas ir jiems suardyti vieno mikroorganizmų štamo turimų fermentų rinkinio nepakanka.

Taip pat žinomi NOM preparatai, kuriuose panaudoti keli štamai (JAV patentai Nr. Nr. 3843517, 3 871 957, 3 959 127, 4 136 024, 4 288 545, 4 452 894, 4 521 515, 4 535 061, 4593 003, 4 732 680, 5 494 580; TSRS a. l. Nr. Nr. 793 375, 823 314, 925 875; RU patentas Nr. 2 122 980).

Šių preparatų trūkumas - juose panaudoti hidrofiliniai NO mikroorganizmai. Dvifazėje sistemoje "vanduo - naftos angliavandeniliai" hidrofiliniai naftą oksiduojantys mikroorganizmai telkiasi vandens fazėje. Jų destruktinė veikla yra ribota, nes jie geba utilizuoti tik vandenyje ištirpusius angliavandenilius.

Artimiausias techninio sprendimo požiūriu yra biopreparatas, kurį sudaro naftą oksiduojančių mikroorganizmų mišinys: *Rhodococcus sp.* BMK-AC-1500D, *Rhodococcus maris* BMK-AC-1501D, *Rhodococcus erythropolis* BMK-AC-1502D, *Pseudomonas stutzeri* BMK-B-1972D, *Candida sp.* BMK-Y-2778D, bei vandens ir grunto apvalymo nuo naftos ir naftos produktų būdas panaudojant minėtą biopreparatą (tarptautinės paraiškos publikacija WO 95/31408). Biopreparatas naudojamas suspensijos pavidalu, kuri išpurškiama ant nafta užteršto grunto bei vandens paviršiaus.

Šio biopreparato trūkumas yra jo ribotas panaudojimas, o jo sudėtyje esantys mikroorganizmai silpnai ardo naftos produktus, kai terpė (gruntas, vanduo) yra mažo druskingumo. Optimalios

biopreparato veikimo sąlygos, kai druskingumas siekia 5 - 10 %. Biopreparato mikroorganizmai lėtai ardo sunkiųjų frakcijų naftos produktus (mazutą), be to biopreparatas naudojamas tik tirpalo pavidalu.

Pateikiamo išradimo uždavinys - sukurti naftą oksiduojančių mikroorganizmų biopreparatą, kurio komponentų derinys užtikrintų jo efektyvumą ir pranašumą palyginti su kitais žinomais analogiškais biopreparatais, kuris tiktų lengvųjų ir sunkiųjų naftos produktų frakcijų destrukcijai ir efektyviai valytų įvairiais naftos angliavandeniliais užterštą gruntą ir vandenį, o taip pat parengti šio biopreparato gavimo būdą bei išplėsti jo panaudojimo galimybę.

Uždavinio sprendimo esmė yra ta, kad biopreparatas nafta ir jos produktais užterštam gruntui ir vandeniui valyti turi tarpusavyje susijusių medžiagų apykaitos produktų mainais naftos angliavandenilius oksiduojančių hidrofilinių ir lipofilinių mikroorganizmų mišinį. Biopreparato mikroorganizmų asociaciją sudarančios hidrofilinės bakterijos *Pseudomonas sp.* GVT 3B, lipofilinės bakterijos *Rhodococcus sp.* GVT 12B, *Bacillus cereus* GVT 17B ir mikromicetai *Candida sp.* GVT 9M, *Trichoderma lignorum* GVT 27M sumaišytos apytikriai lygiomis dalimis ir kultivuojamos kartu.

Biopreparatą sudarantys mikroorganizmai deponuoti VŠĮ "Grunto valymo technologijos" Klaipėdos filialo Mikrobiologijos-chemijos laboratorijos Kolekcijoje (Kiškėnai, Klaipėdos raj. LT), jų charakteristikos yra:

***Pseudomonas sp.* GVT 3B** (Kolekcijos suteiktas registracijos numeris – KMChL:B-3)

Morfologiniai požymiai: Gram-teigiami, judrūs mikroorganizmai; ląstelių dydis – 1,6 x 0,8 µ; kolonijos (ant MPA) pilko atspalvio, apvalios, 4 – 16 mm skersmens, kraštas banguotas, minkštos konsistencijos, kolonijos lengvai nuimamos nuo agarizuotos terpės paviršiaus.

Fiziologinės-biocheminės savybės: metabolizmas – aerobinio tipo; įsisavina acetatą, propionatą, butiratą; asimiliuoja gliukozę, maltozę, arabinozę, laktozę; hidrolizuoja krakmolą; įsisavina amonio ir nitratų azotą; sklado naftos produktus; pH optimalus – 6,7 – 7,3; optimali augimo temperatūra – 27 - 29° C.

***Rhodococcus sp.* GVT 12B** (Kolekcijos suteiktas registracijos numeris – KMChL:B-12)

Morfologiniai požymiai: Gram-teigiami, nejudrūs mikroorganizmai; lazdelių pavidalo, ląstelių dydis – 2,8 x 0,7 µ, gerai auga mineralinėje-organinėje terpėje (g/l: NH₄Cl – 2, NaCl – 2, Na₂HPO₄ – 3, KH₂PO₄ – 0,1; MgSO₄ x 7 H₂O – 2, CaCl₂ x 6 H₂O – 0,01; MnSO₄ x 5 H₂O – 0,02; FeSO₄ x 7 H₂O – 0,01 su acetato ir mielių ekstrakto priedu); kolonijos (ant bulvių agaro) apvalios, 4 - 6 mm skersmens, lygiu kraštu, gleivėtos, minkštos konsistencijos, gerai auga ant MPA.

Fiziologinės-biocheminės savybės: įsisavina acetatą, butiratą, etanolį, butanolį, gliukozę, maltozę, laktozę, auga mineralinėje terpėje, įsisavina amonio ir nitratų azotą; želatinos

neskystina, kazeino neskaldo, krakmolo nehidrolizuoja, skaldo naftos produktus, jų angliavandenilius; pH optimalus – 6,6 – 7,4; optimali augimo temperatūra – 26 - 30° C.

Bacillus cereus GVT 17B (Kolekcijos suteiktas registracijos numeris – KMChL:B-17)

Morfologiniai požymiai: sporinės lazdelės, ilgis – 1,5 – 5,0 μ , sporos ovalinės (susiformuoja per 2 paras auginant ant MPA), kolonijos (ant MPA) šviesaus atspalvio, kraštas lygus, kolonijos minkštos konsistencijos, nuo mitybinio substrato lengvai nuimamos.

Fiziologinės-biocheminės savybės: fakultatyvinis anaerobas, pigmentų negamina, oksidazinis ir katalazinis testai teigiami, Foges-Proskauerio testas taip pat teigiamas; įsisavina citratą ir propionatą; hidrolizina želatiną, kazeiną, krakmolą; utilizuoja nitratus, amonio druskas, aminorūgštis, peptoną, gliukozę, sacharozę, skaldo naftos produktus; pH optimalus – 4,0 – 7,5; optimali augimo temperatūra – 27 - 30° C.

Candida sp. GVT 9M (Kolekcijos suteiktas registracijos numeris – KMChL:M-9)

Morfologiniai požymiai: auginant mineralinėje terpėje ląstelės paprastai esti pavienės, apvalios formos, dydis – 3–4 μ , askosporų negamina.

Fiziologinės-biocheminės savybės: įsisavina acetatą, propionatą, silpnai etanolį; utilizuoja amonio azotą, naftos produktus (ypač alkanus); pH optimalus – 5,5 – 6,5; optimali augimo temperatūra – 26 - 29° C.

Trichoderma lignorum GVT27M (Kolekcijos suteiktas registracijos numeris – KMChL:M-27)

Morfologiniai požymiai: kolonijos sparčiai auga agarizuotoje organo-mineralinėje terpėje (g/l: NaNO_3 – 2, KH_2PO_4 – 1, MgSO_4 – 0,5; KCl – 0,5; FeSO_4 – 0,01; gliukozės – 30, agaro – 40); per 3 paras 25° C temperatūroje kolonijų diametras siekia 8 – 9 cm; kultūra yra tankaus micelio, primenančio plėvelę, pavidalo; micelį sudaro septuoti, stipriai šakoti hifai, kurių skersmuo siekia 1,5 – (10,0-12,0) μ . Brandžios kolonijos paviršius žalio atspalvio, apatinė dalis bespalvė. Chlamidosporos interkaliarinės, bespalvės, 13 – 14 μ skersmens. Kodijakočiai šakoti. Konidijos rutulio formos 3,5 – 4,5 μ skersmens.

Fiziologinės-biocheminės savybės: aerobas, įsisavina sacharozę, gliukozę, krakmolą, melasą, naftos produktų angliavandenilius; azoto šaltinius – amonio druskas, aminorūgštis, peptoną, augalinius ir mielių hidrolizatus; gamina ekstraceliulinius fermentus chitinazes, proteazes; pasižymi antagonistinėmis savybėmis, kurios pasireiškia prieš fitopatogeninius grybus *Fusarium*, *Verticillium*, *Alternarium*. Optimalus pH – 5 – 6; optimali augimo temperatūra – 27 - 30° C.

Biopreparato pranašumas pasireiškia tuo, kad jis yra stabilus. Iš jo nėra eliminuojamos atskiros asociaciją sudarančios NOM kultūros, kadangi jos išskirtos iš valomo nuo naftos produktų substrato, kuriame yra natūrali patvari šių mikroorganizmų bendrija, tarpusavyje susijusi medžiagų apykaitos produktų mainais. Biopreparato privalumas yra tas, kad jis tinka lengvųjų ir sunkiųjų naftos produktų destrukcijai.

Kultūros įsisavina anglies (C) šaltinius: naftos angliavandenilius, sacharozę, gliukozę, krakmolą, galaktozę; azoto (N) šaltinius: amonio druskas, nitratus, baltymų hidrolizatus, aminorūgštis, peptoną.

Biopreparato gavimo būdas apima mikroorganizmų išskyrimą iš nafta ir jos produktais užteršto grunto, jų patalpinimą ir auginimą fermenteriuose giluminiu būdu, auginimui naudojant terpę (g/litru):

NH_4NO_3	1,5 - 2,5
KH_2PO_4	0,75 - 1,25
K_2HPO_4	0,75 - 1,25
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ arba $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,01
kukurūzų ekstrakto	10 ml
sacharozės (arba melasos)	20

induktoriaus (dyzelinio kuro ir mazuto mišinys (1 : 1)) 0,5 - 1,0,

auginant 3 paras, auginimo metu palaikant temperatūrą ribose 25 - 29° C, geriau 27°C, aeruojant santykiu apytikriai 1 tūris oro/1 tūris terpės/per min.

Biopreparatas gaminamas ir gali būti naudojamas sauso - smulkios dispersijos dalelių arba suspensijos pavidalo. Jo sudėtyje yra aktyvios naftą oksiduojančios kultūros, naudojančios įvairių klasių naftos angliavandenilius.

Sauso biopreparato panaudojimo grunto valymui būdas, kai į valomą gruntą, paskleistą 35 - 40 cm storio sluoksniu ir patręštą mineralinėmis trąšomis, geriau prieš 3 paras, valymo sezono metu per kelis kartus, geriau per 3 kartus, įterpia 28 - 32 g/m², geriau 30 g/m², sauso biopreparato, turinčio 3·10⁹ - 5·10⁹ gyvybingų NOM ląstelių viename grame, į valomą gruntą per valymo sezoną periodiškai, ne mažiau kaip 4 kartus, tręšia NPK trąšomis užtikrinant C : N : P santykį 100:5:1 - 100:10:1, geriau 100:7:1, gruntą aeruoja jį kultivuojant ne mažiau kaip 2 kartus per savaitę ir palaiko drėgmę 65 - 70% grunto vandentalpos.

Biopreparato suspensijos panaudojimo grunto valymui būdas, kai į valomą gruntą, paskleistą 35 - 40 cm storio sluoksniu ir patręštą mineralinėmis trąšomis, geriau prieš 3 paras, valymo sezono metu per kelis kartus, geriau per 3 kartus, įterpia 2 - 4 litrus/m², geriau 3 litrus/m², biopreparato NOM skystos suspensijos pavidalu, turinčios ne mažiau 3·10⁹ - 5·10⁹ gyvybingų NOM ląstelių viename mililitre, į valomą gruntą, per valymo sezoną periodiškai, ne mažiau kaip 4 kartus, tręšia NPK trąšomis, užtikrinant C : N : P santykį 100:5:1 - 100:10:1, geriau 100:7:1, gruntą aeruoja jį kultivuojant ne mažiau kaip 2 kartus per savaitę ir palaiko drėgmę 65 - 70% grunto vandentalpos.

Nafta ir jos produktais užteršto grunto ir vandens valymo būdas, naudojant biopreparatą, yra pranašesnis palyginti su prototipu, nes taikomas ne vienkartinis, o daugkartinis valomo grunto tręšimas bei preparato naudojimas, tuo užtikrinama aukšta NOM koncentracija substrate ir intensyvesnis valymas.

Valymo būdo efektyvumas ir pranašumas pasireiškia intensyviu valomo grunto aeravimu, jį kultivuojant 2 kartus per savaitę.

Biopreparato sudėtyje yra aktyvios bakterijų ir mikromicetų kultūros, kurios naudoja naftos produktų - mazuto angliavandenilius kaip anglies (C) šaltinį ir gaudami pakankamą mineralinę mitybą (preparato NOM mitybai reikalingas azotas, fosforas, kalis ir kai kurie kiti elementai, mikroelementai) bei turėdami palankias ekologines sąlygas (pH, drėgmė, temperatūra, aeravimas), naftos produktus suardo iki galutinių irimo produktų - anglies dvideginio ir vandens.

Biopreparato panaudojimo vandens valymui būdas, kai nafta ir jos produktais užterštą vandens paviršių apdoroja sorbentais ir juos surenka, po to ant sorbentais apdoroto vandens paviršiaus išpurškia 1,5 - 2,0 litrus/m² biopreparato NOM skystos suspensijos, turinčios $3 \cdot 10^9$ - $5 \cdot 10^9$ gyvybingų NOM ląstelių viename mililitre.

Biopreparato panaudojimo vandens valymui būdo privalumas, valant naftos produktais užterštą vandens paviršių, pasireiškia kombinuotu valymo priemonių naudojimu: pradžioje teršalai renkami sorbentais, o jų likučiai likviduojami NOM preparatu.

Biopreparatas nafta ir naftos produktais užterštam gruntui ir vandeniui valyti gautas tokiu būdu.

Biopreparato gavimui mikroorganizmų kultūros buvo išskirtos iš VŠĮ. "Grunto valymo technologijos" Klaipėdos filialo naftos produktais užteršto grunto ir vandens. Kultūros saprofitinės, nepatogeniškos. Mikroorganizmai buvo auginami fermenteriuose giluminiu būdu. Naudojama terpė (g/litru): NH_4NO_3 - 2; KH_2PO_4 - 1; K_2HPO_4 - 1; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,5; $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ - 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ arba $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ - 0,01; kukurūzų ekstrakto - 10 ml; sacharozės (arba melasos) - 20; induktoriumi panaudotas dyzelinio kuro ir mazuto mišinys (1 : 1) - 1. Kultūros sumaišomos lygiomis dalimis, auginamos 27 - 29° C temperatūroje. Aeracija - 1 tūris oro/1 tūris terpės/per 1 min. Auginimo trukmė - 3 paros. Gautas biopreparatas yra veiklus plačiame temperatūros diapazone. Jis tinka naudoti esant temperatūrai nuo 6 iki 30° C, geriau nuo 8 iki 28° C.

Biopreparatas gaminamas suspensijos ir sauso mikroorganizmų preparato pavidalo. Vienu atveju NOM suspensija iš karto įterpiama į valomą nuo naftos produktų gruntą. Kitu atveju

terpės NOM koncentruojami. Koncentratas maišomas su apsauginiu substratu (talkas, diatomitas, bentonitas). Džiovinama iki orasausės būsenos.

Biopreparato aktyvumas vertinamas naudojant mišrią naftą oksiduojančių mikroorganizmų - *Pseudomonas sp.* GVT 3B, *Rhodococcus sp.* GVT 12B, *Bacillus cereus* GVT 17B, *Candida sp.* GVT 9M, *Trichoderma lignorum* GVT 27M - asociaciją. NOM sauso pavidalo preparatu (su apsaugine terpe) užkrečiamas (inokuliuojamas) substratas, užterštas naftos produktais - mazuto ir dyzelinio kuro mišiniu (santykiu 1 : 1). Mazuto angliavandenilių sudėtis yra tokia: parafinų - naftenų angliavandenilių - 15 %, olefinų ir ciklodiolefinų - 5 %, alkilaromatinių angliavandenilių - 1 %, alkildiaromatinių angliavandenilių - 4 %, poliaromatinių angliavandenilių - 20 %, benzolinių dervų - 30 %, alkoholio - benzolinių dervų - 25 %. Mazuto tankis (kg/m^3) - 956,4. NOM preparato naudojama 1 % nuo inokuliuojamo substrato svorio. Bandomasis substratas praturtinamas NPK mineraliniais junginiais. Palaikoma jo drėgmė 65 % nuo substrato vandentalpos. Substratas aeruojamas kasdien jį permaišant. Substratas laikomas optimalioje NOM augimui 27° C temperatūroje.

Preparato destruktinis aktyvumas per pirmąsias 8 paras siekė 720 - 740 mg/kg grunto/per parą. Per tą laiką nuo pradinio naftos produktų mišinio (dyzelinis kuras+mazutas, lygiomis dalimis) kiekio buvo suardyta 79 - 88 %.

Pažymėtina, kad panaudotame naftos produkte buvo didelis kiekis sunkiai skaldomų dervų (iki 55 %). Kai substrate yra didelis teršalo-dervų kiekis, stipriai pasireiškia jų hidrofobiškumas. Tas apsunkina grunto drėkinimą, o tuo pačiu ir teršalo destrukciją.

Gavus pagaminto biopreparato palankius destruktinio aktyvumo rezultatus atliktas eksperimentinis jo panaudojimas valymo darbams. Pažymėtina, kad biopreparatas vienodai efektyvus naudojant jį tiek sausame, tiek suspensijos pavidale.

Intensyviai NOM veiklai grunto vandenilio jonų koncentracija turi būti 5,0 - 9,0 ribose (optimumas - 7,0). Temperatūra - 6 - 30° C (optimumas - 27° C).

Biopreparato panaudojimas iliustruojamas pavyzdžiais.

1 pavyzdys. Mazutu užteršto grunto valymas naudojant grunto tręšimui sumažintus NPK kiekius

Atliekama valomo mazutu užteršto grunto cheminė analizė. Duomenys (vidurkiniais dydžiais) tokie: pH - 7, organinė anglis (C) - 1,5 %, orasausio grunto azotas (N, bendras) - 0,27 %, azotas (N) skystoje grunto frakcijoje - N_{NH_4} (mg/l) - 70,0; N_{NO_2} (mg/l) - 0,5; N_{NO_3} (mg/l) - 27,0; Ca, Mg karbonatai - 4,92 %, fosforas (P) bendras judrus, pagal P_2O_5 , mg/100 g

orasausio grunto - 0,1; fosforas skystoje dirvožemio frakcijoje - P mineralinis (mg/l) 7,3; P organinis tirpus (mg/l) 2,6; P bendras tirpus (mg/l) 9,9.

Pagrindinių mikroelementų valomajame grunte kiekiai (mg/kg grunto) nustatyti tokie: boras (B) - 20,0; švinas (Pb) - 19,0; manganas (Mn) - 220,0; nikelis (Ni) - 17,0; baris (Ba) - 150,0; vanadis (V) - 49,0; molibdenas (Mo) - 0,8; kobaltas (Co) - 2,2; varis (Cu) - 7,0; cinkas - (Zn) - 40,0; kadmis (Cd) - mažiau 3,0.

Nei vienas šių mikroelementų neviršija leistinos ribinės normos. Tokių svarbių mikroelementų NOM veiklai, kaip molibdenas, kobaltas, varis, manganas, koncentracijos yra per mažos. Analitiniai duomenys rodo, kad gruntuose, užterštuose 25 - 30 g mazuto/1 kg grunto, azoto ir fosforo yra apie 50 kartų mažiau to kiekio, kuris reikalingas taršai mazutu likviduoti, naudojant NOM.

Valomo grunto mikrobiologinė analizė parodė, kad pradinis heterotrofų (augančių MPA terpėje) kiekis siekia apie 2 mln. kolonijų/grame grunto, o autochtonų naftą oksiduojančių bakterijų - 50 - 100 tūkst. kolonijų/grame grunto.

Normaliai mazuto biodestrukcijai šiuos mikroorganizmų kiekius intensyvinančiomis jų dauginimąsi priemonėmis reikia padidinti 50 - 100 kartų.

Valymas atliekamas tokiu būdu. Užterštas gruntas (112 tonos) supilamas 35 - 40 cm sluoksniu ant 200 m² ploto drenuojančio pagrindo. Pradinis teršalo - mazuto kiekis valomame grunte - 21 740 mg/kg grunto. Gruntas tręšiamas per sezoną (kas mėnesį vasaros metu) 4 kartus NPK trąšomis. Panaudota trąšų: amonio nitrato (NH₄NO₃, 34 % N) 25 kg/200 m², arba 126 g/m²; superfosfato (CaH₂PO₄ × H₂O × 2 CaSO₄, 23 % P₂O₅) 14,7 kg/200 m² arba 73,5 g/m²; kalio chlorido (KCl) 10,5 kg/200m² arba 52,5 g/m². Tręšimams buvo panaudota mineralinių trąšų (amonio nitrato, superfosfato, kalio chlorido) kilogramais:

I tręšimas - 3,6; 2,1; 1,5

II tręšimas - 7,2; 4,2; 3,0

III tręšimas - 7,2; 4,2; 3,0

IV tręšimas - 7,2; 4,2; 3,0.

NOM biopreparatas į valomą gruntą įterpiamas skystos suspensijos pavidalu - 3 litrai suspensijos 1 m² ploto valomo grunto arba NOM sauso biopreparato 30 g/m² ploto. Biopreparatas į gruntą įterpiamas jį išpurškiant iš asenizacijos mašinos aukšto spaudimo siurbliu. Biopreparatas išpurškiamas valymo eigoje 3 kartus: gegužės, birželio ir liepos mėn. Biopreparatas į gruntą įterpiamas patręšus jį NPK trąšomis (į trečią parą po tręšimo).

NOM yra aerobai. Jų fiziologinei - biocheminei veiklai reikalingas deguonis. Dėl to gruntas reguliariai - 2 kartus per savaitę - buvo kultivuojamas, purenamas. Sekama valomo grunto

drėgmė. Drėgmė buvo nustatoma Ohaus firmos drėgmėmačiu MB 200 ir palaikoma 65 - 70 % grunto vandentalpos.

Labai reikšmingas veiksnys grunto biovalymui yra temperatūra. NOM veiklai tinkamiausia temperatūra - 27° C. Valymo zonoje paties šilčiausio - liepos mėnesio - vidutinė oro temperatūra siekė 17° C. Grunto temperatūra beveik prilygsta oro temperatūrai. Ryškūs temperatūros svyravimai paros eigoje - naktį temperatūra keliais laipsniais sumažėja.

Efektyvaus grunto biovalymo sezonas tęsiasi 120 parų: nuo gegužės mėn. antrosios pusės iki rugsėjo pradžios. Tinkamiausias biovalymui liepos mėnuo. Užtikrinus NOM dauginimuisi tinkamas ekologines sąlygas jų kiekis valomajame grunte siekia 300 mln. egz./grame grunto.

Per grunto biovalymo sezoną suardyta (200 m² plote 35 cm storio grunto sluoksnyje, turinčiame 112 tonų grunto, kuris pradiniam etape užterštas 21 740 mg/kg mazuto, taigi mazuto grunte - 2 435 kg, biovalymo pabaigoje - po 120 parų, liko 3210 mg/kg mazuto dervų arba 359 kg mazuto dervų visame 200 m² plote) 200 m² plote 2076 kg mazuto arba 85 % pradinio jo kiekio.

Greičiausiai suardomi mazuto parafinų-naftenų bei olefinų angliavandeniliai. Per mėnesį jie suardomi pilnutinai - 100 %. Per tą patį laiką mazuto aromatinių angliavandenilių suyra 30 - 35 %, o didelio molekulinio svorio junginiai - dervos degraduojamos sunkiausiai.

2 pavyzdys. Mazutu užteršto grunto valymas naudojant grunto tręšimui padidintus NPK kiekius

Užterštas gruntas, kaip ir pirmajame pavyzdyje, supilamas ant drenuojančio pagrindo 35 - 40 cm sluoksniu. Gruntas užterštas mazutu - 21 700 mg/kg arba visame 230 m² plote (jame 124 800 kg užteršto grunto) yra 2 708 kg mazuto. Panaudota NPK trąšų valomo grunto 1 m²: amonio nitrato - 253 g, superfosfato - 146 g ir kalio chlorido - 106 g. Tręšimams buvo panaudota NPK trąšų (amonio nitrato, superfosfato, kalio chlorido) kilogramais:

I tręšimas - 8,3; 4,8; 3,5;

II tręšimas - 16,6; 9,6; 7,0;

III tręšimas - 16,6; 9,6; 7,0;

IV tręšimas - 16,6; 9,6; 7,0.

NOM preparato inokuliavimas į gruntą, grunto kultivavimas (aeravimas), drėgmės reguliavimas atliktas kaip ir pirmajame pavyzdyje. Skirtumas palyginti su pirmuoju pavyzdžiu - 2 kartus padidintas tręšimas NPK mineralinėmis trąšomis. Per tą patį, kaip ir pirmajame pavyzdyje, biovalymo laiką (120 parų) suardyta mazuto nuo pradinio 21 700 mg/kg grunto iki 2 930 mg/kg mazuto dervos. Taigi suardyta 18 770 mg mazuto 1 kg grunto. Visame 230 m² plote suardyta 2342 kg mazuto arba 86 % jo pradinio kiekio.

Mazuto degradavimo greičio per parą (mg/g grunto) duomenys parodė, kad padidinto NPK tręšimo sąlygomis biodegradavimas iki 70 - 80 paros vyksta 40 - 90 % greičiau palyginti su mažesnio NPK tręšimo variantu. Po 80 parų biovalymas mažiau ir labiau tręštuose sklypuose išsilygina. Tas paaiškinama tuo, kad abiem atvejais grunte lieka mazuto dervos, kurios NOM sunkiai ir lėtai ardamos.

Pažymėtina, kad didesnio NPK tręšimo sąlygomis mazuto ardymo greitis per parą pradinėje ardymo stadijoje (pirmąjį mėnesį) pasiekė net 610 mg/kg valomo grunto.

Biopreparatas gali būti naudojamas įvairių vandens telkinių (upių, ežerų, tvenkinių) apvalymui nuo naftos produktų.

3 pavyzdys. Vandens valymas

Pirmas valymo etapas - nafta bei jos produktai surenkami sorbentais. Tai efektyvi priemonė, padedanti per trumpą laiką surinkti didelius naftos kiekius. Naudotini sorbentai: Joresorb sorbentas, granulės, lengvai paskleidžiamos vandens paviršiuje, adsorbcijos galia - sorbentas/nafta 1 : 6,5; Qualisorb Gold sorbentas - granulės, lengvos, sugeria naftos produktus santykiu sorbentas/nafta 1 : 2; Sphagsorb sorbentas - samaninių durpių produktas, nafta surenkama nuo naftuoto paviršiaus per keletą minučių, tačiau didžiausia sorbcijos galia pasižymi aktyvuota anglis "USVR-VIP", 1 kg sorbento surenka 30 - 40 kg naftos, sorbcijos greitis - 30 - 40 sekundžių.

Gėlo vandens telkinys (600 m²) užterštas dyzeliniu kuru, kurio kiekis 400 kg. Panaudotas aktyvuotos anglies sorbentas, 13 kg, išpilant jį ant vandens paviršiaus. Surinkta 320 kg dyzelinio kuro. Vandenyje emulguotas dyzelinis kuras (80 kg) apdorotas biopreparato suspensija 1,5 - 2,0 litrai/m², išpurškiant ją ant vandens paviršiaus. Panaudota 1000 litrų biopreparato. Vandens temperatūra - 20° C. Praėjus 14 parų nuo preparato panaudojimo, teršalo - dyzelinio kuro nerasta.

Patentuojamo biopreparato komponentų derinys užtikrina jo efektyvumą ir pranašumą palyginti su kitais žinomais analogiškais biopreparatais. Jis tinka lengvųjų ir sunkiųjų naftos produktų frakcijų destrukcijai. Biopreparato sudėtyje esantys mikroorganizmai ardo parafinus - naftenus, olefinus ir ciklodiolefinus, alkilaromatinčius, poliaromatinčius angliavandenilius, o taip pat benzolines dervas, be to biopreparatas yra veiklus plačiame temperatūros diapazone, nežiūrint grunto ir vandens žymių temperatūros svyravimų paros ir valymo sezono eigoje. Jis tinka naudoti esant temperatūrai nuo 6 - 8 °C iki 28 - 30 °C. Patentuojamas biopreparatas gali būti efektingai panaudotas avarijų metu į aplinką (gruntą, vandenį) patekusiems angliavandeniliams teršalams likviduoti įvairiose gamtinėse klimato zonose.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Biopreparatas nafta ir jos produktais užterštam gruntui ir vandeniui valyti, turintis naftos angliavandenilius oksiduojančių mikroorganizmų mišinį, besiskiriantis tuo, kad naftos angliavandenilius oksiduojančių mikroorganizmų mišinį sudaro tarpusavyje susijusių medžiagų apykaitos produktų mainais hidrofilinių ir lipofilinių mikroorganizmų asociacija.

2. Biopreparatas pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad mikroorganizmų asociacija sudarančios hidrofilinės bakterijos (deponuotos VŠĮ "Grunto valymo technologijos" Klaipėdos filialo Mikrobiologijos-chemijos laboratorijos Kolekcijoje, Kiškėnai, Klaipėdos raj., LT) *Pseudomonas sp.* GVT 3B (reg. Nr. KMChL:B-3), lipofilinės bakterijos *Rhodococcus sp.* GVT 12B (reg. Nr. KMChL:B-12), *Bacillus cereus* GVT 17B (reg. Nr. KMChL:B-17) ir mikromicetai *Candida sp.* GVT 9M (reg. Nr. KMChL:M-9), *Trichoderma lignorum* GVT 27M (reg. Nr. KMChL:M-27) sumaišytos apytikriai lygiomis dalimis ir kultivuojamos kartu.

3. Biopreparato pagal 1 ir 2 punktus gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad mikroorganizmus išskiria iš nafta ir jos produktais užteršto grunto, juos patalpina ir augina fermenteriuose giluminiu būdu, auginimui naudoja terpę (g/litru):

NH_4NO_3	1,5 - 2,5
KH_2PO_4	0,75 - 1,25
K_2HPO_4	0,75 - 1,25
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ arba $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,01
kukurūzų ekstrakto	10 ml
sacharozės (arba melasos)	20

induktoriaus (dyzelinio kuro ir mazuto mišinys (1 : 1)) 0,5 - 1,0,

augina 3 paras, auginimo metu palaiko temperatūrą ribose 25 - 29° C, geriau 27° C, aeruoja santykiu apytikriai 1 tūris oro/1 tūris terpės/per min.

4. Biopreparato pagal 1 ir 2 punktus panaudojimo grunto valymui būdas, besiskiriantis tuo, kad į valomą gruntą, paskleistą 35 - 40 cm storio sluoksniu ir patręštą mineralinėmis trąšomis, geriau prieš 3 paras, valymo sezono metu per kelis kartus, geriau per 3 kartus, įterpia 28 - 32 g/m², geriau 30 g/m², sauso biopreparato, turinčio 3·10⁹ - 5·10⁹ gyvybingų NOM ląstelių viename grame, valomą gruntą per valymo sezoną periodiškai, ne mažiau kaip 4 kartus, tręšia NPK trąšomis užtikrinant C : N : P santykį 100:5:1 - 100:10:1, geriau 100:7:1, gruntą aeruoja jį kultivuoiant ne mažiau kaip 2 kartus per savaitę ir palaiko drėgmę 65 - 70% grunto vandentalpos.

5. Biopreparato pagal 1 ir 2 punktus panaudojimo grunto valymui būdas, besiskiriantis tuo, kad į valomą gruntą, paskleistą 35 - 40 cm storio sluoksniu ir patręštą mineralinėmis trąšomis, geriau prieš 3 paras, valymo sezono metu per kelis kartus, geriau per 3 kartus, įterpia 2 - 4 litrus/m², geriau 3 litrus/m², biopreparato NOM skystos suspensijos pavidalu, turinčios ne mažiau $3 \cdot 10^9$ - $5 \cdot 10^9$ gyvybingų NOM ląstelių viename mililitre, valomą gruntą, per valymo sezoną periodiškai, ne mažiau kaip 4 kartus, tręšia NPK trąšomis, užtikrinant C : N : P santykį 100:5:1 - 100:10:1, geriau 100:7:1, gruntą aeruoja jį kultivuojant ne mažiau kaip 2 kartus per savaitę ir palaiko drėgmę 65 - 70% grunto vandentalpos.

6. Biopreparato pagal 1 ir 2 punktus panaudojimo vandens valymui būdas, kai nafta ir jos produktais užterštą vandens paviršių apdoroja sorbentais ir juos surenka, besiskiriantis tuo, kad ant sorbentais apdoroto vandens paviršiaus išpurškia 1,5 - 2,0 litrus/m² biopreparato NOM skystos suspensijos, turinčios $3 \cdot 10^9$ - $5 \cdot 10^9$ gyvybingų NOM ląstelių viename mililitre.